昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2012, 55(7): 782 - 789 ISSN 0454-6296

显微注射青霉素 G 获得单感染 *Wolbachia* 和单感染 *Cardinium* 白背飞虱品系

张向菲，赵冬晓，洪晓月*
（南京农业大学昆虫学系，南京 210095）

摘要：*Wolbachia* 和 *Cardinium* 都是广泛存在于节肢动物体内的一类母系遗传的共生细菌，可以通过不同方式操纵寄主的生殖行为。*Wolbachia* 和 *Cardinium* 感染同一寄主在自然界比较常见，但是在某些可以同时感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的寄主中其单感染品系较难发现。本研究检测了云南文山(YN)、海南三亚(HN)这 2 个不同地理种群中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况；以双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的白背飞虱 *Sogatella furcifera* 海南种群为实验材料，运用显微注射方法对双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的白背飞虱若虫注射不同浓度青霉素 G 以获得单感染品系。结果表明：白背飞虱自然种群中单感染 *Wolbachia* 比率极低，本实验用到的海南种群未检测到单感染 *Wolbachia* 成虫；通过显微注射青霉素 G 的方法可以从白背飞虱双感染品系中筛选获得单感染品系，当青霉素 G 注射浓度为 0.2%(w/v)，注射龄期为 5 龄时得到单感染品系效率最高；F5 代的检测结果显示显微注射得到的单感染品系可以稳定遗传。本研究为获得单感染品系白背飞虱提供了快捷方法，同时为其他双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 节肢动物不同感染品系的筛选提供参考。

关键词：*Wolbachia*；*Cardinium*；白背飞虱；显微注射；青霉素 G
中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)07-0782-08

Establishment of singly *Wolbachia*- and singly *Cardinium*-infected whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*) lines by microinjecting penicillin G

ZHANG Xiang-Fei, ZHAO Dong-Xiao, HONG Xiao-Yue* (Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Wolbachia* and *Cardinium* are both maternally inherited intracellular bacteria that infect a wide range of arthropods and are associated with various reproductive abnormalities in their hosts. Infection with both *Wolbachia* and *Cardinium* is reasonably common, yet it is relatively difficult to find the individuals infected with single symbiont in doubly infected hosts naturally. In this study, *Wolbachia* and *Cardinium* were detected in two populations of the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* (Horváth), collected from Wenshan of Yunnan (YN) and Sanya of Hainan (HN). Using the Hainan population of doubly infected *S. furcifera* as the material, we developed a new technique of microinjecting different concentrations of penicillin G into nymphs of the planthopper. The results showed that the rate of individuals infected with only *Wolbachia* was very low in natural populations of *S. furcifera*, and no singly *Wolbachia*-infected individual was found in the Hainan population. We got singly-infected individuals by using microinjection of penicillin G in the laboratory. The singly infected lines can be produced most efficiently by injecting 0.2% (w/v) penicillin G into the 5th instar nymphs. The result of PCR detection of F5 progenies showed that the singly infected lines obtained by microinjection can be inherited stably. These results here will provide a speedy method to get singly infected lines, and this method can be used to establish lines with different infection type for other arthropods doubly infected with *Wolbachia* and *Cardinium*.

Key words: *Wolbachia*; *Cardinium*; *Sogatella furcifera*; microinjection; penicillin G

基金项目：国家公益性行业(农业)科技项目(200903051, 200803003)；教育部博士点基金优先发展领域项目(20110097130005)
作者简介：张向菲，女，1986 年生，山东淄博人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生态学，E-mail: 2009102083@njau.edu.cn
*通讯作者 Corresponding author, Tel.: 025-84395339; E-mail: xyhong@scau.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-04-26；接受日期 Accepted: 2012-06-25

节肢动物感染母系遗传的胞内共生菌是很普遍的(Douglas, 1989; Werren *et al.*, 1995; Hurst and Jiggins, 2000; Russell *et al.*, 2003; Duron *et al.*, 2008)。这些共生菌中分布最为广泛的是 *Wolbachia*。最近的研究发现约有 66% 的节肢动物感染了 *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008)。*Wolbachia* 通过对寄主进行生殖调控而为感染的雌虫提供生殖优势，以有利于其在寄主种群中的维持和扩散(Hoffmann and Turelli, 1997)。*Cardinium* 是继 *Wolbachia* 之后第 2 个被发现能调控寄主生殖行为的共生菌(Hunter *et al.*, 2003)。近年来已经发现 *Cardinium* 能够引起雌性化、诱导孤雌生殖、诱导胞质不亲和、影响寄主适合度以及改变寄主的产卵行为(Zchori-Fein *et al.*, 2001; Weeks and Breeuwer, 2001; Hunter *et al.*, 2003; Weeks and Stouthamer, 2004)。

Wolbachia 和 *Cardinium* 感染同一寄主的现象是很普遍的(Weeks *et al.*, 2003; Gotoh *et al.*, 2007; Duron *et al.*, 2008)。尽管 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 都具有对寄主进行生殖调控的功能，但是目前对 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在同一寄主内分别对寄主生殖的影响，以及彼此之间的相互作用的研究还很少。主要因为 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 都是革兰氏阴性菌，从双感染品系中筛选出单感染品系的难度很大。White 等(2009)通过低浓度抗生素处理，成功从恩蚜小蜂 *Encarsia inaron* (Walker)双感染品系中筛选到单感染 *Wolbachia* 和单感染 *Cardinium* 品系，并发现 *Wolbachia* 能够诱导 CI，而 *Cardinium* 不能诱导 CI。这种利用抗生素喂食筛选单感染品系的方法花费时间长，并且有实验证实长时间喂食抗生素会对寄主产生负面的生理影响(刘莉等, 2008)。因此本实验尝试使用显微注射青霉素 G 的方法获得单感染品系，此种方法大大缩短了筛选的时间，避免了长期喂食抗生素对昆虫生理产生的影响。

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváth)，属半翅目飞虱科，是目前我国水稻上主要的迁飞害虫之一，国外分布于日本、朝鲜、东南亚、太平洋岛屿及澳大利亚北部；国内除新疆外，各稻区均有发生。20 世纪 90 年代以来其发生面积和为害损失已超过褐飞虱 *Nilaparvata lugens*，成为水稻生产威胁最大的害虫(洪晓月等, 2007)。

在本实验室早先的研究中发现，*Wolbachia* 和 *Cardinium* 共同感染现象在中国白背飞虱中很普遍，但单感染 *Wolbachia* 白背飞虱比率极低甚至在某些种群中未检测到单感染 *Wolbachia* 的白背飞虱(数据未发表)。目前国际上尚未有单感染 *Wolbachia* 和单感染 *Cardinium* 对白背飞虱生殖影响的研究。本研究以白背飞虱云南文山(YN)、海南三亚(HN)种群为实验材料，检测了这 2 个不同地理种群中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况。研究发现双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的白背飞虱在自然种群中比率最高，而单感染 *Wolbachia* 在各个种群的感染率非常低，在海南种群中未检测到单感染 *Wolbachia* 的白背飞虱成虫。本实验利用显微注射的方法对不同龄期白背飞虱若虫分别注射一定浓度的青霉素 G 以筛选单感染品系白背飞虱。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

本实验所用白背飞虱为 2011 年 6 月采自云南文山(22.57°N 104.47°E)和海南三亚(18.25°N 109.54°E)水稻田中。在田间采集时，一部分成虫(2 个种群均收集 70 头以上)将其浸泡于 100% 乙醇中，随后带回实验室于 -20℃ 保存用于田间感染率的检测；一部分活虫(若虫和成虫)带回实验室用籼稻感虫品系汕优 5 号(种子购自南京农业大学神州种业)稻苗在烧杯中分开饲养，饲养条件为温度 27±1℃，相对湿度 60%~80%，光周期 16L∶8D。在体视镜下挑选体表无明显寄生物的白背飞虱成虫用于感染率检测。

1.2　白背飞虱总 DNA 的提取

白背飞虱 DNA 提取的方法参照 O'Neill 等(1992)的方法。每头成虫作为一个独立样本，放入装有 40 μL STE 缓冲液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)的 1.5 mL 离心管中，用研磨棒研磨均匀。加入 2.5 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL)，4 000 r/min 离心 1 min，37℃ 孵育 1 h，然后 95℃ 变性 5 min，4 000 r/min 离心 1 min，随后置于 -20℃ 保存或取 2 μL 直接做模板进行 PCR 扩增。

1.3　PCR 扩增

Wolbachia 的检测使用一对特异性引物扩增 *wsp* 基因，扩增出一段长度为 599 bp 的片段(Zhou *et al.*, 1998)。上下游引物分别为 wsp-81F (5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′)和 wsp-691R (5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′)。对于 *Cardinium*

的检测，使用一对特异性引物扩增出一段450 bp 左右的 16S rDNA 基因的部分片段（Weeks *et al.*, 2003）。上下游引物分别为 CLOF（5′-GCGGTGAAAATGAGCGTG-3′）和 CLOr1（5′-ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT-3′）。

PCR 反应体系总体积为 25 μL 的扩增反应体系由以下成分组成：2 μL DNA 模板，14.3 μL 灭菌水，2.5 μL 10 × buffer，2.5 μL $MgCl_2$（25 mmol/L），2.5 μL dNTPs（2.5 mmol/L），0.2 μL Taq DNA 聚合酶（5 U/μL，大连 TaKaRa 公司），上游和下游引物各 0.5 μL（10 μmol/L each）。*wsp* 基因 PCR 反应条件为：95℃预变性 3 min；95℃ 30 s，55 μL 45 s，72℃ 1 min 共 35 个循环；最后一次循环后再 72℃延伸 5 min。*Cardinium* 16S rDNA 基因的 PCR 反应条件为：94℃预变性 2 min；94℃ 30 s，57℃ 30 s，72℃ 30 s 扩增 35 个循环；最后一次循环后再 72℃延伸 5 min。扩增产物的电泳检测：取 PCR 反应产物 10 μL，在 1.5%（g/mL）的琼脂糖凝胶上 110 V 电压电泳检测，在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统（Bio-Rad，Hercules，CA）下观察并记录结果。阳性对照为已检测过的确定为 *Wolbachia wsp* 和 *Cardinium* 16S rDNA 基因片段的 PCR 回收产物，阴性对照为超纯水。

1.4 白背飞虱 100% 双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 以及不感染品系的筛选

在一次性透明塑料杯（直径 60 mm，杯高 110 mm）中种上约 15 粒水稻种子，待稻苗长至杯口时，从田间采集的白背飞虱自然种群中随机挑取雌雄成虫各 1 头，接入杯中，让其交配产卵。一周后，将成虫挑出，提取 DNA，PCR 检测 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况。待卵全部孵化为若虫，继续饲养双亲均为双感染的个体获得双感染品系，继续饲养双亲均为不感染的个体获得不感染品系。待 F1 代长至成虫时重复上述步骤 4 ~5 代后，从中随机挑取 30 头白背飞虱若虫进行 PCR 检测，若均为双感染 *Wolbachia-Cardinium*，则获得 100% 感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的白背飞虱纯系；若均不感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium*，则获得 100% 不感染的白背飞虱纯系。

1.5 显微注射

将待注射的不同龄期白背飞虱若虫分别置于不同的离心管（2 mL）中，并将离心管置于冰上约 3 ~ 5 min，待若虫处于暂时性昏迷状态，将其放在注射平台上开始注射。注射位置为白背飞虱若虫胸腹之间凹陷处。

显微注射仪：Eppendorf Inject Man NI 12；拉针仪：Sutter P97；气泵：FemtoJet 5247。

拉针参数：Heat 627，Pull 0，Vel 30，Time 250。

将注射后的若虫放置在盛有水稻苗的玻璃试管中单独饲养，雄虫羽化后即可提取 DNA 进行 PCR 检测，雌虫羽化后则将其转移到一次性透明塑料杯中与不感染的雄虫交配，产生后代以建立注射品系，一周后取出雌虫用于 PCR 检测确定其感染情况。

1.6 感染品系的遗传稳定性检测

将注射后羽化的雌虫与未交配的不感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的雄虫接入一次性透明塑料杯中，让其交配产卵，检测雌虫的感染情况确定其感染品系。杂交试验持续 5 代后，将若虫挑出，提取 DNA，PCR 检测 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况。将检测结果与 F0 代感染情况比较，研究注射后的不同感染品系能否在种群中稳定地保存下来。

1.7 数据统计与分析

将得到的羽化率及羽化后的不同感染类型的比率数据经过整理和统计后，将具体数据输入 SPSS 软件。用 ANOVA 比较不同浓度青霉素 G 注射同一龄期白背飞虱若虫，相同浓度青霉素 G 注射不同龄期白背飞虱若虫后其羽化率及感染类型比率的差异，均值的多重比较用 Tukey 氏检验。

2 结果与分析

2.1 不同地理种群白背飞虱上 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染率

云南种群检测了 79 头白背飞虱上 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染率（不感染：12.66%；单感染 *Cardinium*：22.78%；单感染 *Wolbachia*：2.53%；双感染：62.03%），海南种群检测了 173 头白背飞虱上 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染率（不感染：11.56%；单感染 *Cardinium*：20.81%；单感染 *Wolbachia*：0%；双感染：67.63%）。根据 PCR 检测的结果发现，采自云南文山与海南三亚的白背飞虱种群其双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的比率较高，单感染 *Cardinium* 所占的比率次之。2 个种群在双感染感染率及单感染 *Cardinium* 感染率之间均未表现出较大的差异。单感染 *Wolbachia* 的比例非常低，甚至在海南种群中未检测到单感染 *Wolbachia* 的白背飞

虱成虫。

2.2　注射不同浓度青霉素 G 后白背飞虱若虫羽化率比较

海南种群双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 品系的白背飞虱不同龄期若虫注射了不同浓度青霉素 G 后羽化率比较见表 1。统计分析显示随着若虫龄期的增加注射相同浓度青霉素 G 时其羽化率显著提高（$P<0.01$）；注射同一龄期白背若虫时随着注射青霉素 G 浓度的增加其羽化率显著下降（$P<0.01$）。

表 1　注射不同浓度青霉素 G 后白背飞虱的羽化率

Table 1　The emergence rate of *Sogatella furcifera* after microinjecting different concentrations of penicillin G

若虫龄期 Nymphal instar	青霉素 G 浓度（%，w/v） Concentration of penicillin G	注射若虫数 Number of injected nymphs	羽化数 Emergence number	羽化率（%） Emergence rate
1 龄 1st instar	0.1	28.00 ± 1.20	10.00 ± 1.53	35.36 ± 3.29 a
	0.15	25.33 ± 2.85	8.00 ± 1.53	31.64 ± 5.54 a
	0.2	27.33 ± 2.33	8.67 ± 0.88	31.75 ± 2.32 a
	0.25	23.33 ± 0.88	6.00 ± 0.58	25.72 ± 2.39 b
	0.3	32.67 ± 1.45	11.33 ± 1.20	28.37 ± 5.75 b
	0(CK)	20.00 ± 2.50	14.00 ± 1.80	70.00 ± 1.92 c
2 龄 2nd instar	0.1	31.33 ± 3.48	14.33 ± 1.76	45.61 ± 0.85 a
	0.15	24.00 ± 1.00	11.33 ± 1.33	47.88 ± 7.88 a
	0.2	28.67 ± 1.86	12.67 ± 0.88	44.16 ± 0.53 a
	0.25	22.67 ± 1.45	9.33 ± 0.67	41.16 ± 1.16 b
	0.3	16.67 ± 2.40	12.33 ± 1.76	42.44 ± 3.49 b
	0(CK)	30.00 ± 4.33	22.20 ± 3.17	74.07 ± 0.93 c
3 龄 3rd instar	0.1	26.00 ± 2.65	14.00 ± 2.08	53.35 ± 2.42 a
	0.15	27.33 ± 1.45	13.67 ± 0.33	50.17 ± 1.73 a
	0.2	28.67 ± 1.86	14.67 ± 0.88	51.24 ± 1.48 a
	0.25	30.00 ± 2.89	15.33 ± 1.45	51.14 ± 0.59 a
	0.3	24.67 ± 2.03	12.00 ± 1.15	48.54 ± 0.74 b
	0.35	29.33 ± 1.86	14.00 ± 0.58	47.91 ± 2.00 b
	0.4	30.00 ± 1.53	14.67 ± 1.67	49.30 ± 6.70 b
	0(CK)	21.67 ± 2.17	16.90 ± 1.99	77.78 ± 2.22 c
4 龄 4th instar	0.2	28.00 ± 1.53	15.33 ± 1.20	54.65 ± 2.02 a
	0.25	27.33 ± 1.45	14.00 ± 1.15	51.06 ± 1.59 a
	0.3	30.67 ± 1.76	16.00 ± 2.08	51.80 ± 4.78 a
	0.35	29.33 ± 2.33	15.33 ± 1.20	52.38 ± 2.37 a
	0.4	28.00 ± 1.80	14.33 ± 0.67	51.69 ± 4.81 a
	0.45	32.67 ± 1.20	16.00 ± 1,53	48.77 ± 2.80 b
	0.5	24.67 ± 1.45	12.00 ± 1.15	48.44 ± 1.86 b
	0(CK)	27.20 ± 1.60	21.33 ± 1.41	78.51 ± 3.29 c
5 龄 5th instar	0.2	28.00 ± 1.73	16.67 ± 1.76	59.22 ± 2.67 a
	0.25	28.00 ± 2.08	14.67 ± 1.20	52.43 ± 2.08 a
	0.3	31.33 ± 2.60	18.00 ± 1.00	58.25 ± 6.07 a
	0.35	34.00 ± 3.61	17.67 ± 1.76	52.02 ± 0.57 a
	0.4	31.00 ± 2.08	14.67 ± 1.76	47.14 ± 3.60 b
	0.45	30.00 ± .61	14.00 ± 1.00	47.37 ± 3.77 b
	0.5	30.67 ± 3.18	15.00 ± 1.73	48.80 ± 0.61 b
	0(CK)	24.00 ± 1.59	21.60 ± 2.08	89.66 ± 3.18 c

CK：灭菌水 Sterile water. 表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误；不同的字母代表同一龄期内不同浓度之间存在显著差异（$P<0.05$；Tukey 氏 HSD 检验）。Values are mean ± *SE* of three replications. Different letters indicate significant difference between different concentrations of penicillin G at the same instar of *S. furcifera* nymph at $P<0.05$ (Tukey's HSD test).

2.3 注射不同浓度青霉素 G 后白背飞虱若虫感染情况

海南种群白背飞虱双感染品系若虫注射不同浓度青霉素 G 羽化后的感染情况见图 1。对白背飞虱若虫注射不同浓度的青霉素 G 后，可以得到单感染 *Wolbachia*、单感染 *Cardinium* 及不感染品系。部分若虫在注射青霉素 G 后检测结果显示仍然为双感染，说明青霉素 G 未将其体内的共生菌彻底清除。图 1(A)显示在青霉素 G 浓度一致的情况下，随着若虫龄期的增加双感染比率显著升高($P<0.01$)，说明随着若虫龄期的增加相同浓度的青霉素 G 去除其体内共生菌的效率下降；图 1(D)显示同一龄期的若虫随着青霉素 G 注射浓度的增加不感染品系的比率显著提高($P<0.01$)，说明随着青霉素 G 注射浓度的提高其去除相同龄期的白背飞虱若虫体内共生菌的效率提高。对得到的单感染 *Wolbachia* 和单感染 *Cardinium* 品系数据分析发现：用浓度为 0.2% (w/v)的青霉素 G 注射 5 龄若虫时得到的单感染 *Cardinium* 及单感染 *Wolbachia* 比率均为最高(图 1：B；图 1：C)。

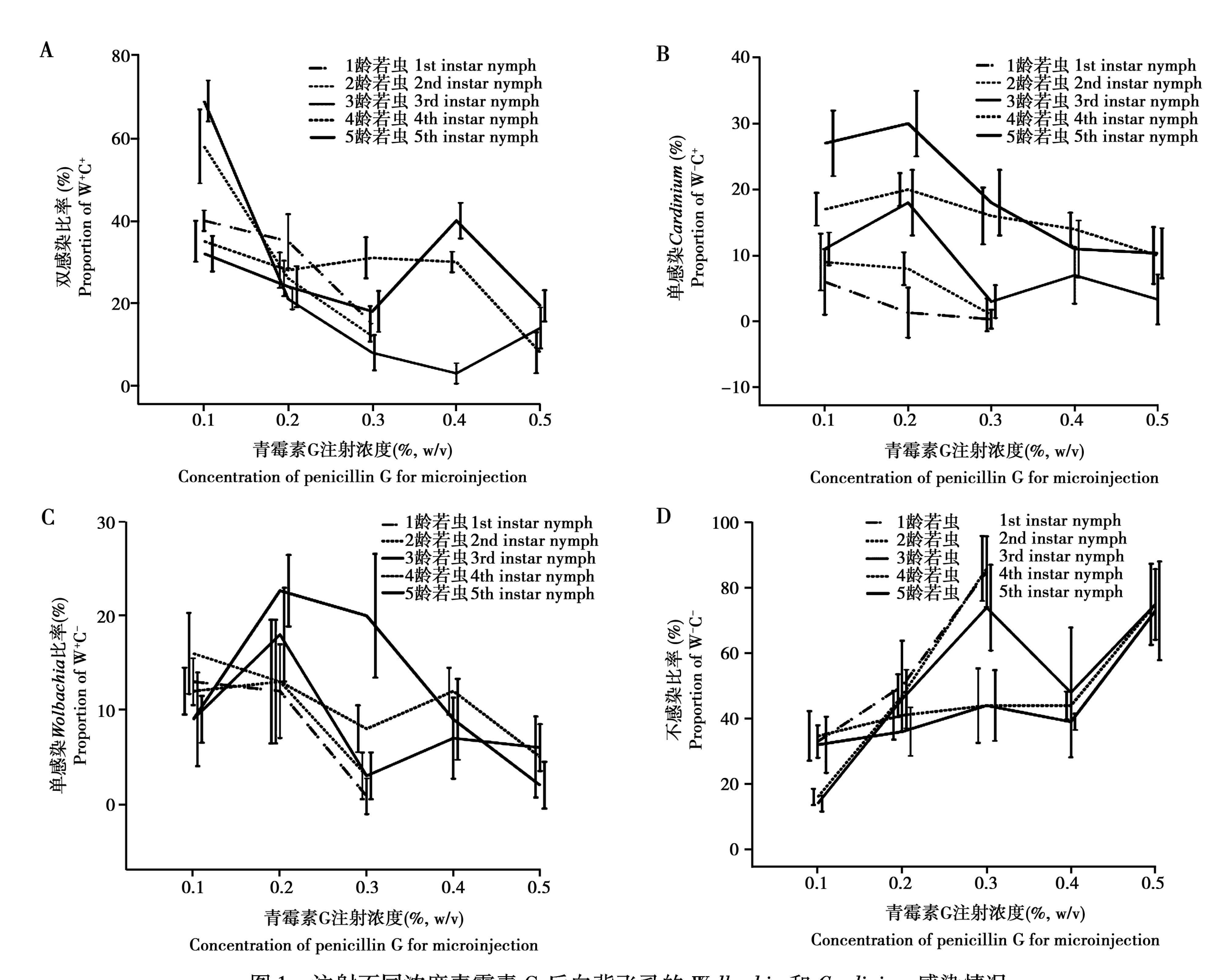


图 1 注射不同浓度青霉素 G 后白背飞虱的 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 感染情况

Fig. 1 The infection status of *Wolbachia* and *Cardinium* in *Sogatella furcifera* after microinjecting different concentrations of penicillin G

2.4 注射不同浓度青霉素 G 后不同感染品系白背飞虱 F5 代感染情况

检测 F5 代的感染情况(表 2)，发现不同的感染品系在 F5 代均有部分恢复为双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 品系的现象，但是大部分 F5 代保持了与 F0 代相同的感染类型。检测结果说明通过显微注射青霉素 G 的方法所得到的不同感染品系可以在种群中稳定地遗传下来。数据统计分析结果显示各感染品系在遗传稳定性上无显著差异($P>0.05$)。

表 2　不同感染品系白背飞虱 F5 代感染情况

Table 2　The infection status of *Wolbachia* and *Cardinium* in F5 generation of *Sogatella furcifera* after microinjecting penicillin G

感染类型 Infection type	F0[a]	F5[b]	感染率(%) Infection rate
不感染品系 W^-C^-	71.00 ±8.62	58.33 ±5.84	82.58 ±2.12 a
单感染 *Wolbachia* 品系 W^+C^-	35.67 ±3.48	27.00 ±2.65	75.71 ±0.73 a
单感染 *Cardinium* 品系 W^-C^+	25.67 ±1.20	21.00 ±0.59	82.02 ±2.77 a

[a]注射后羽化的雌虫数量 Number of emerged females after injection; [b]F5 代感染类型与 F0 代相同的单雌系数量 Number of isofemale lines of F5 generation with the same infection type as F0 generation. 表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误；同一列数据后相同字母表示没有显著差异($P>0.05$, Tukey 氏 HSD 检验)。Values are mean ± *SE* of three replications. The same letter following data in the same column means no significant difference ($P>0.05$, Tukey's HSD test).

3　讨论

对不同地理种群白背飞虱体内 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的感染情况分别进行检测，结果显示单感染 *Wolbachia* 的比率非常低，甚至在 2011 年采集的海南种群中未检测到单感染 *Wolbachia* 的白背飞虱成虫，因此在实验室条件下很难筛选到单感染 *Wolbachia* 的品系。有研究发现抗生素可以明显抑制稻飞虱体内类酵母共生菌的数量(Chen *et al*., 1981b; Raguraman and Jayarai, 1983; 徐红星等, 2000), Gotoh 等(2007)第 1 次使用青霉素 G 以及高温处理从叶螨 *Tetranychus pueraricola* 双感染品系中成功筛选到单独感染 *Wolbachia* 和单独感染 *Cardinium* 品系。但此方法消耗时间长，而且长时间的抗生素喂食对昆虫带来的不利影响很难排除。刘莉等(2008)研究发现用抗生素(四环素和链霉素)处理的食物饲喂贡嘎蝠蛾 *Hepjalus gonggaensis* 4 龄幼虫 1 个月后,肠道主要消化酶的种类和酶活性都发生了显著变化。这可能是长期使用抗生素导致肠道菌群紊乱,消化生理发生改变,从而导致一些消化酶活性下降甚至完全失去活性。利用显微注射青霉素 G 的方法筛选不同感染品系消耗时间短，一次性注射的方式也降低了抗生素对昆虫的生理所带来的消极影响的可能性。

本研究运用显微注射青霉素 G 的方法对双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的白背飞虱若虫注射不同浓度的青霉素 G 并检测了羽化后的感染情况，结果显示利用显微注射青霉素 G 的手段可以很快速得到白背飞虱各种不同感染品系。在将筛选到的各个不同感染品系单独饲养 5 代后将 F5 代的感染情况与 F0 代对比，检测发现有少部分的感染情况发生变化，恢复成为双感染的品系，这可能是因为亲本在检测时其共生菌并未彻底消除只是含量非常低，低于 PCR 可以检测的范围，在无抗生素条件下饲养一段时间后昆虫体内的共生菌又会恢复。但是大部分的若虫其注射后的 F0 代与 F5 代在感染情况上是一致的，说明注射后的不同品系可以在种群中稳定地遗传。这证实了显微注射抗生素是一种有效的筛选不同感染品系的方法。

研究发现在白背飞虱的各个龄期中随着青霉素 G 浓度的增加若虫的羽化率均显著下降($P<0.01$)；随着若虫龄期的增加注射相同浓度青霉素 G 时其羽化率显著提高。Noda 等(2001)在用抗生素喂食灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 筛选不感染品系时发现：当喂食的抗生素浓度低于 0.1% 时灰飞虱可以正常羽化，但是当喂食的抗生素浓度升高时灰飞虱成虫的羽化时间会出现推迟，当浓度达到 0.25% 时这种羽化推迟的现象非常显著。这说明抗生素超过一定浓度时对昆虫的羽化有负面影响，并且这种负作用会随着浓度的升高而加重。所以会出现相同龄期若虫随着抗生素注射浓度的增加其羽化率降低的现象。结果中发现的白背飞虱若虫龄期增加而注射相同浓度青霉素 G 时去除若虫体内共生菌的效率显著下降($P<0.01$)的现象可能是因为随着龄期的增长白背飞虱体内的 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 的菌量增加而导致的，目前已有相关研究证明稻飞虱体内类酵母共生菌的数量随寄主虫龄的增大而增加(Chen *et al*., 1981a)。本研究发现相同龄期的白背飞虱若虫随着注射青霉素 G 浓度的提高去除寄主体内共生菌的效率显著增加($P<0.01$)。这个结果可以解释为：相同龄期的若虫体

内的共生菌数量接近，增加了抗生素的浓度则去除效率增加。

2007 年谢蓉蓉等检测了江苏镇江种群朱砂叶螨的田间感染情况，检测的 40 头成虫中单感染 *Cardinium* 的有 6 头其余均为双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium*；2004 年采自山西西安的朱砂叶螨未筛选到单感染 *Cardinium* 的品系；2009 年陈小琳等在我国朱砂叶螨江苏镇江自然种群没检测到单感染 *Wolbachia* 的叶螨(本实验室研究，未发表)。这些感染率的检测结果表明在某些双感染昆虫中其单感染品系较难发现，这对研究 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 分别以及共同对生殖的影响及两种共生菌之间的关系带来了难度。有研究证实双感染品系与单感染品系对宿主的生殖调控存在差异：Ros 和 Breeuwer (2009)研究发现，在苔螨 *Bryobia sarothamni* 中，单感染 *Cardinium* 的雄虫能够诱导 CI，双重感染 *Cardinium* 和 *Wolbachia* 以及单独感染 *Wolbachia* 的雄虫不能诱导 CI，且双感染和单感染 *Wolbachia* 的雌螨不能拯救单独感染 *Cardinium* 的雄虫所诱导的 CI；所用的 4 个感染品系(双感染、单感染 *Cardinium*、单感染 *Wolbachia*、不感染)不是通过对双重感染品系处理筛选获得，而是从不同的地理种群筛选获得。因而该研究并不能科学阐述这两种菌间的互作。*Cardinium* 和 *Wolbachia* 都可以对宿主的适合度进行调控，单感染品系与双感染品系在对宿主适合度上的调控上可能存在差异，目前这方面的研究还未开展，原因是在很多可以双感染 *Cardinium* 和 *Wolbachia* 的昆虫中其单感染品系很难筛选。因此，亟需寻找可以从双感染品系中获得单感染品系的方法，并且这种方法要相对快速、有效。本实验证实可以通过注射青霉素 G 从双感染品系中快速获得其他所有感染品系。这种方法减少了长期喂食抗生素对昆虫的影响,也大大缩短了筛选的时间，提高了实验效率。这种快速有效获得不同感染品系的手段可以推广应用到所有的双感染 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 节肢动物的不同感染品系的筛选工作中。注射所得到的单感染 *Wolbachia* 和单感染 *Cardinium* 品系对于研究 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 分别以及共同对寄主的影响非常有帮助，亦有助于探索 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 是否存在竞争或协同互利关系。

参 考 文 献 (References)

Chen CC, Cheng LL, Hou RF, 1981a. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. Histological observation and population changes of the symbiote. *Zeit. Ang. Entomol.*, 91: 321 – 327.

Chen CC, Cheng LL, Hou RF, 1981b. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. II. Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbiote. *Zeit. Ang. Entomol.*, 92: 440 – 449.

Douglas AE, 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 64: 409 – 434.

Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstadter J, Hurst G, 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.*, 6: 27.

Gotoh T, Noda H, Ito S, 2007. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity*, 98(1): 13 – 20.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH, 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.*, 281: 215 – 220.

Hoffmann AA, Turelli M, 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. In: O' Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH eds. Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford University Press, New York, USA. 42 – 80.

Hong XY, Ding JH, 2007. Agricultural Entomology. 2nd ed. China Agriculture Press, Beijing. 87 – 93. [洪晓月, 丁锦华, 2007. 农业昆虫学. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社. 87 – 93]

Hunter MS, Perlman SJ, Kelly SE, 2003. A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 2185 – 2190.

Hurst GDD, Jiggins FM, 2000. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg. Infect. Dis.*, 6: 329 – 336.

Liu L, Wang ZK, Yu HW, Mu DD, Yuan Q, Yin YP, 2008. Effects of feeding on tetracycline and streptomycin on growth and gut digestive enzymes of *Hepjalus gonggaensis* larvae. *Chin. Bull. Entomol.*, 45 (2): 272 – 275. [刘莉, 王中康, 俞和韦, 穆冬冬, 袁青, 殷幼平, 2008. 饲喂四环素和链霉素对贡嘎蝠蛾幼虫生长和肠道消化酶的影响. 昆虫知识, 45(2): 272 – 275]

Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, Deng K, 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 727 – 737.

O' Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2699 – 2702.

Raguraman S, Jayarai S, 1983. Effect of neem on yeast-like symbionts harbored by brown planthopper. *Int. Rice Res. Notes*, 13(5): 32 – 33.

Ros VID, Breeuwer JAJ, 2009. The effects of, and interactions between, *Cardinium* and *Wolbachia* in the doubly infected spider mite *Bryobia sarothamni*. *Heredity*, 102: 413 – 422.

Russell JA, Latorre A, Sabater-Munoz B, Moya A, Moran NA, 2003. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.*, 12: 1061 – 1075.

Weeks AR, Breeuwer JAJ, 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 2245 – 2451.

Weeks AR, Stouthamer R, 2004. Increased fecundity associated with infection by a Cytophaga-like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 271: S193 – S195.

Weeks AR, Velten R, Stouthamer R, 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 1857 – 1865.

Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 261: 55 – 63.

White JA, Kelly SE, Perlman SJ, Hunter MS, 2009. Cytoplasmic incompatibility in the parasitic wasp *Encarsia inaron*: disentangling the roles of *Cardinium* and *Wolbachia* symbionts. *Heredity*, 102: 483 – 489.

Xu HX, Zheng XS, Tong ZH, Lv ZX, Chen JM, Yu XP, Tao LY, 2000. Effects of insecticides on the symbiotes in brown planthopper. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 12(3): 126 – 128. [徐红星，郑许松，童中华，吕仲贤，陈建明，俞晓平，陶林勇，2000. 杀虫剂对褐飞虱体内共生菌的影响. 浙江农业学报，12(3): 126 – 128]

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL, Hunter MS, 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 12555 – 12560.

Zhou WG, Rousset F, O'Neill SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 509 – 515.

（责任编辑：武晓颖）